

〔研 究〕

LSG 分類からみた Non-Hodgkin lymphoma の細胞生物学的解析

静岡赤十字病院検査部

八木 弥八 大塚 証一 伊東寿美子 山田アツ子
井上 敏男

名古屋保健衛生大学医学部病理学教室

笠原 正男 黒田 誠 溝口 良順 三木 芳夫

神奈川歯科大学病理学教室

渡辺 是久

悪性リンパ腫は、系統的リンパ節あるいは臓器内リンパ組織に発生する Neoplastic growth を呈する病態の総称である。それらに関する分類は古く、1832年、Thomas Hodgkin による腫瘍形態の研究に始まり、Rappaport の分類に至っている(表1)。これらは単に腫瘍細胞としてのリンパ細胞の形態学的所見を基盤に行われたものであるが、最近、リンパ球系に関する細胞生物学的特異性と免疫学的发展を背景に、形態学的分類に多くの知見が導入され、悪性リンパ腫に関する分類にも多くの変遷が加わって来た。総論的に述べれば、1978年より Lymphoma Study Group (LSG) による新しい分類が提案され用いられるようになった。更に、WHO 分類も提案されたが、この2つは比較的類似している。特に LSG の特徴は、細胞の大きさを重点として、免疫学的性格を含めた分類法である

(表2)。今回、我々の実験目的は、5症例について LSG 分類を用い、それらの悪性リンパ腫の細胞の性格を形態学的、組織化学的及び電子顕微鏡的に検討し、LSG 分類に分けられたおのおのの腫瘍細胞の細胞生物学的特異性について解析することである。

I 材料並びに検索方法

材料：昭和55年～57年度において、当院にて病理組織学的に悪性リンパ腫と診断された5症例を用いて検索した。

方法：

A. 材料の処理方法

外科的に摘出されたリンパ節をただちに割合し、その割面を8枚の slide glass に捺印し、細胞診の材料とした。その組織は大きさに応じ、それぞれ4つの組織片に分割し、1)凍結切片標本、2) paraffin 包埋用、3) 電子顕微鏡用、4) ヒツジ赤血球に対する表面 marker (E. roset, EAC. roset 形成用) として用いた。

B. 検索方法

a) 細胞診学的方法

i) 一般光顕の方法

8枚の捺印標本のうち3枚を ether-alcohol 等量液固定後、それぞれ1枚ずつ papanicolaou

表1 Rappaport の分類

Rappaport (1966)

Nodular-Diffuse
Undifferentiated type Histiocytic type
Histiocytic-lymphocytic (mixed cell) type
Lymphocytic, poorly differentiated
Lymphocytic, well differentiated
Follicular form of above type

文献1)より引用

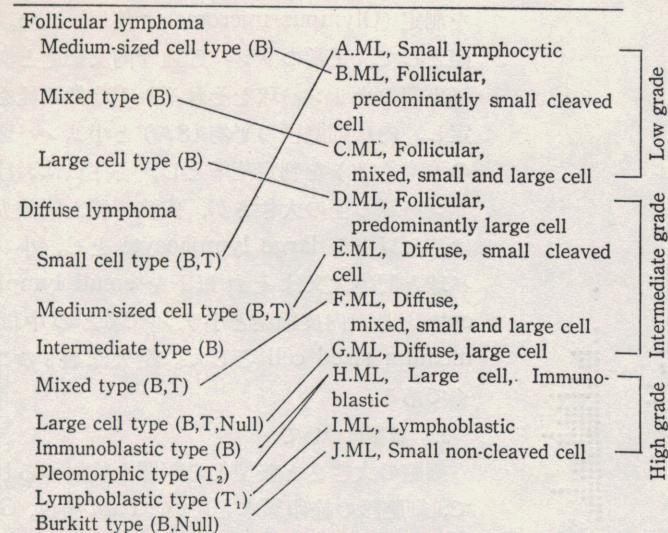


表 2 L.S.G 分類と WHO 分類
文献 8) より引用

染色, PAS 染色, methylgreen-pyronin 染色を行い, 更に 1 枚は捺印, 乾燥, methyl alcohol 固定にて Giemsa 染色を施行した。

ii) 酵素組織学的方法 (Azo dye 法)

イ) Non specific esterase (N. Estase);

捺印標本を冷 acetone に 30 秒間固定し, α -naphthol AS-acetate 液 37°C, 20 分間反応, Azo 色素法を行った。

ロ) Acid phosphatase 染色 (AcPase);

4°C calcium formalin 固定 (30 分間), α -naphthol phosphate, pararose aniline chloride 液で 20 分間染色した。

ハ) β -glucuronidase (β -Gase);

4°C calcium formalin 固定 (30 分間), naphthol AS-BI glucuronide, pararose aniline chloride 溶液で 30 分間染色した。

b) 凍結切片組織材料

-20°C cryostat にて 4 μ に薄切し, 4°C calcium formalin にて固定, 及び冷 acetone 固定後, 細胞診材料と同一の酵素染色を行った。

c) paraffin 包埋材料

イ) 通常光顕法;

10% buffer formalin (0.1 mol phosphate buffer pH 7.4), 固定後, paraffin 包埋し, 染色は hematoxylin eosin (H.E) 染色, methylgreen-pyronin (M.G.P) 染色, 鍍銀染色 (渡辺

法) 等を施行した。

ロ) 免疫酵素組織検索法;

PAP 法にて施行し, DAKO 社製キットを用い IgG, IgA 及び IgM について検索を行った。

d) ヒツジ赤血球に対する表面 marker, E. roset, EAC. roset 法

新鮮組織の一部を 2 枚の slide glass にて圧迫し, homogenate し, 0.1 mol 冷 phosphate buffer pH 7.4 溶液, 5 ml 中に混和し, 1800 rpm, 15 分間遠心分離後, 上清を捨て, 細胞層を pipette に採り, リンパ球分離液 S.M.F 3 ml に重層し, 1600 rpm, 30 分間遠心し, リンパ球を分離, それらリンパ球と E 及び EAC. roset 形成の反応について検討した。

e) 電顕的検索法

2% glutal aldehyde, 1% Osmium 二重固定後, 脱水, Epon 包埋を行い, 酢酸ウラニウム・鉛二重染色にて, 透過型電子顕微鏡観察を行った。

II 結 果

1. 細胞の大きさ

paraffin 切片による H.E 染色標本を用い, 腫瘍病変が結節状か, びまん性増殖かを観察し, 各症例ごと, 1000 倍で 100 個の細胞の胞体径

表 3

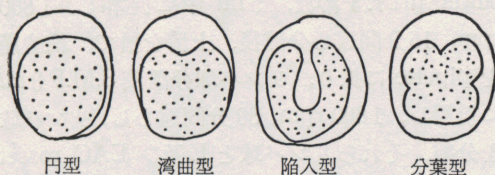
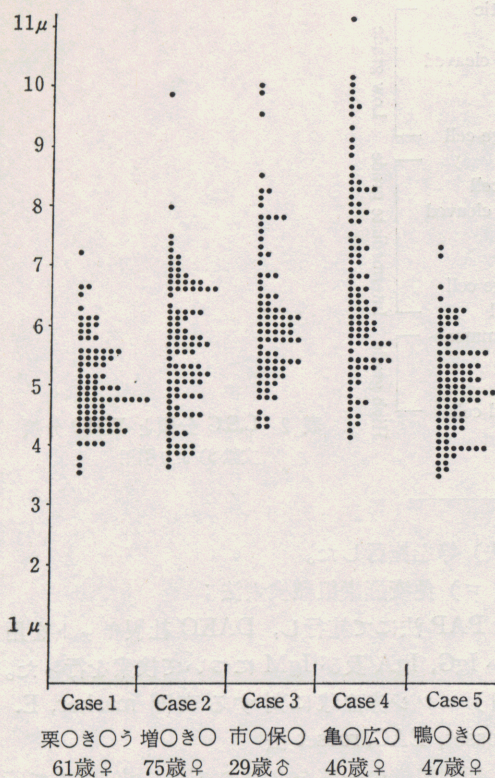


図 1 核不整型の 4 type

表 4 核不整型の出現率 (%)
(各症例ごと 200 個細胞測定)

Case. 年齢・性	円 型	湾曲型	陥入型	分葉型
1. 61 歳 ♀	73	18	12	0
2. 75 歳 ♀	71	16	3	0
3. 29 歳 ♂	84	16	0.4	0
4. 46 歳 ♀	51	* 31	* 11	5
5. 47 歳 ♀	14	30	41	15

を測定 (Olympus micrometer 使用) した。対照として、正常のリンパ節血管内皮細胞とリンパ小節の小リンパ球をそれぞれ 100 個の径を測定し、内皮細胞径の平均 (8μ) と小リンパ球径の平均 (4μ) を判定基準とし、各症例におけるリンパ球の径の大きさが、内皮細胞と同等大又はそれ以上を large lymphocyte とし、小リンパ球と同等大又はそれ以下を small lymphocyte とし、内皮細胞と小リンパ球との中間を medium sized cell とした。結果は表 3 のごとくである。

2. 核型について

細胞の大きさと核型との相関を検討する目的で、細胞診の捺印標本を用い、Pap. 染色、Giemsa 染色にて、各症例ごと 200 個の細胞を選び、その不整型の出現率を測定した。今回はこの不整型として、円形、湾曲型、陥入型、分葉型の 4 つの type に分類した (図 1)。結果は表 4 で示してある。

3. 細胞 marker の検索

a) 酵素組織化学的観察法

捺印細胞診材料及び凍結切片材料についての N. Estase, AcPase, β -Gase 染色による細胞質の酵素活性の強・弱による染色性を、弱いものから強いものにそれぞれ (一) ~ (卅) と表現し、T 細胞系、B 細胞系を推定した。結果は表 5 のごとくである。

b) 細胞表面 globulin (Smlg) の観察

paraffin 切片を用いた PAP 法による globulin 含有する腫瘍細胞の IgG, IgA, IgM について表面 globulin の出現しないものから多く出現するものに (一) ~ (卅) と表現した。

c) ヒツジ赤血球による E. roset, EAC. roset の出現率

各症例による E. roset, EAC. roset の出現率を測定し、T 細胞系、B 細胞系由来を推定した。結果は表 6 のごとくである。

d) 電顕的観察法

電顕的に T 細胞系、B 細胞系の核型、細胞表面突起及び細胞内小器官の相関を求める目的で、各症例の核型、細胞表面及び細胞内小器官

表 5 酵素組織化学染色による細胞 marker (活性弱(-)~強(卅))

Case. 年齢・性	N. Estase	AcPase	β -Gase
1. 61 歳 ♀	+		+
2. 75 歳 ♀	-	-~+	+
3. 29 歳 ♂	-~+	+	+
4. 46 歳 ♀	-	+	++
5. 47 歳 ♀	-	卅	卅

表 6 各症例の細胞表面 marker (陽性++~卅, 陰性 -~+) 及びヒツジ赤血球に対する T リンパ球, B リンパ球の出現率

Case. 年齢・性	表面 marker globulin			ヒツジ赤血球 rosset 反応	
	IgG	IgA	IgM	E.rosset	EAC. rosset
1. 61 歳 ♀	卅	++	++~卅	11 (%)	11 (%)
2. 75 歳 ♀	++	-~+	-	70	28.8
3. 29 歳 ♂	卅	卅	+	73	30
4. 46 歳 ♀	-	-~+	-~+	*97.7	2.2
5. 47 歳 ♀	+	+	++~卅	-	-

表 7 各症例における電顕的観察

Case. 年齢・性	細胞質		核		
	表 面	細胞質内	核 型	クロマチン	核小体
1. 61 歳 ♀	一部アメーバ状突起	ribosome やや増量	円型~cleaved	増量	著明
2. 75 歳 ♀	-	-	-	-	-
3. 29 歳 ♂	一部アメーバ状突起	mitochondria 増加	円型~cleaved	増量	不明瞭
4. 46 歳 ♀	不 明	clustered dense body, lysosome	cleaved	smooth	著明
5. 47 歳 ♀	多数突起	mitochondria 脂肪滴	cleaved	smooth	不明瞭

表 8

Case. 年齢・性	主 訴	組織細胞の形態像			酵素組織化学及び免疫学的検索	
		増殖型	細胞の大きさ	核不整型	酵素活性	表面 marker
1. 61 歳 ♀	頸部多発腫瘍	diffuse	small	non cleaved	活性弱	B cell type
2. 75 歳 ♀	左頸部腫瘍	diffuse	medium sized or mixed type	non cleaved	活性弱	B cell type
3. 29 歳 ♂	全身リンパ節腫大	-	medium sized or mixed type	non cleaved	活性弱	B cell type
4. 46 歳 ♀	全身皮疹	-	mixed type	cleaved	活性強	T cell type
5. 47 歳 ♀	右腋窩リンパ節腫脹	diffuse	small	cleaved	活性強	B cell type

の構造を比較した。結果は表 7 のごとくである。

以上の方法及び観察した結果, それらを各症例についてまとめてみた(表 8)。更に各症例について詳細すると次のごとくである。

Case 1.

腫瘍細胞はびまん性に増殖し, 細胞の大きさは 4~6 μ の間に peak が集中した分布で小型の細胞像を示す。核不整型は比較的少なく, 形態

的には円形像を呈している。酵素化学染色では N. Estase, β -Gase に弱陽性, 酵素抗体法では IgG, IgM に陽性が著明であった。E. rosset, EAC. rosset はともに 11% であった。電顕像では細胞表面は比較的 smooth であるが一部にアメーバ状の突起がみられる。核は円型~陥入型を呈している。核小体は著明である。この結果から, 診断は small lymphocytic diffuse type, B cell lymphoma (図 2・a~d)。

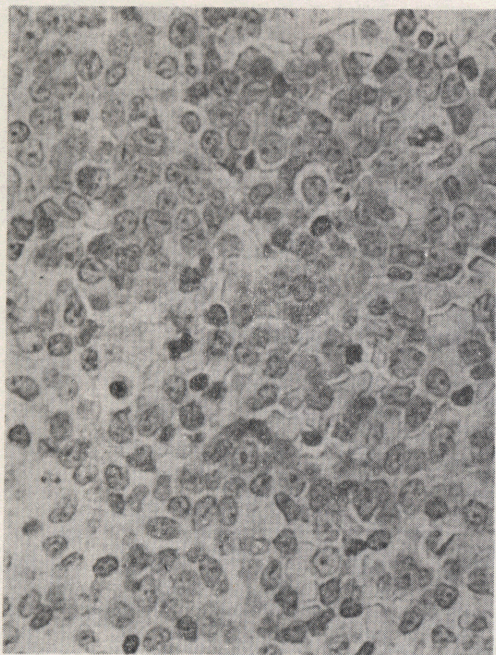


図 2・a H. E 染色 ×400

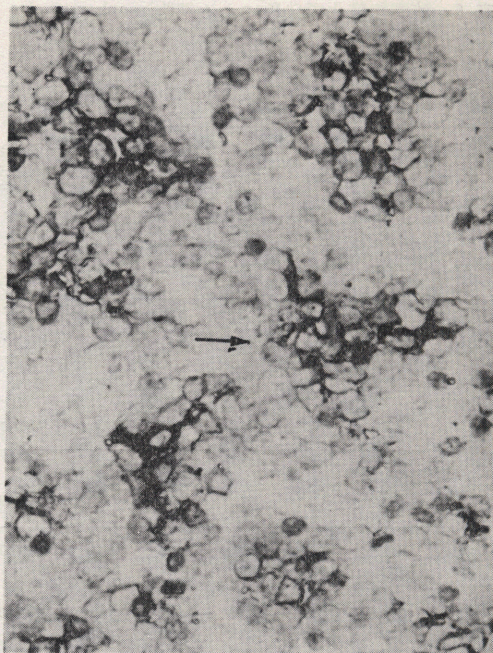


図 2・c IgG 陽性 ×400

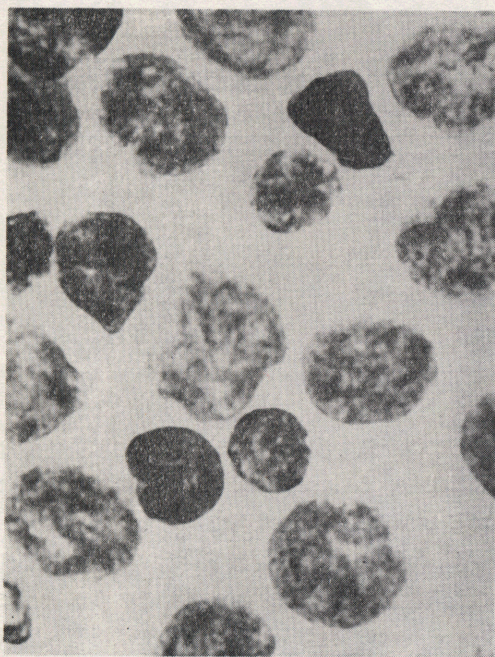


図 2・b 一部に核不整型がみられる
Giemsa 染色 ×1000

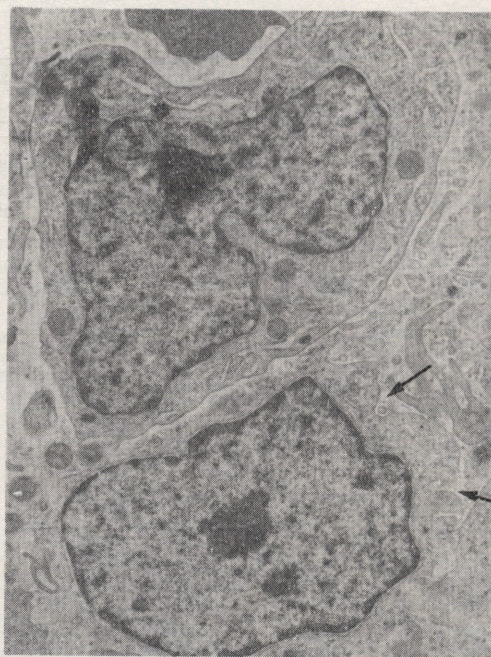


図 2・d 細胞表面の一部にアメーバ状突起がみられ、核は円型、湾曲型を示す ×5000

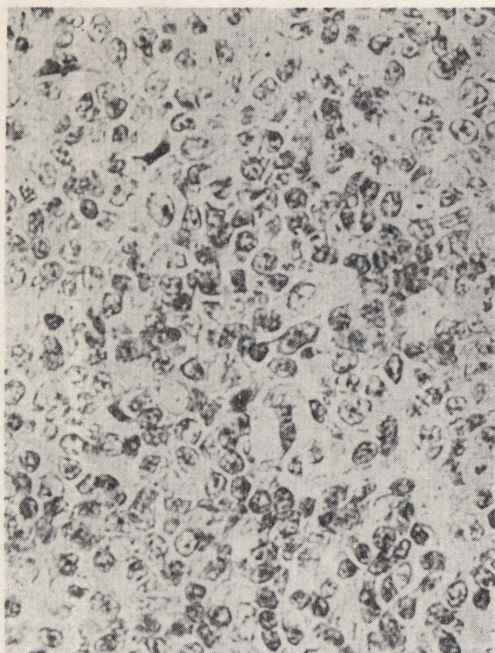


図 3・a びまん性増殖を呈する腫瘍組織像
×200

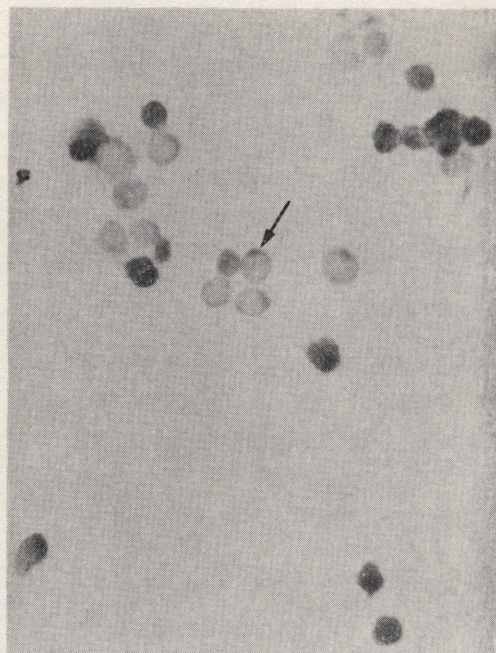


図 3・c β -Gase 染色 (陽性) ×400

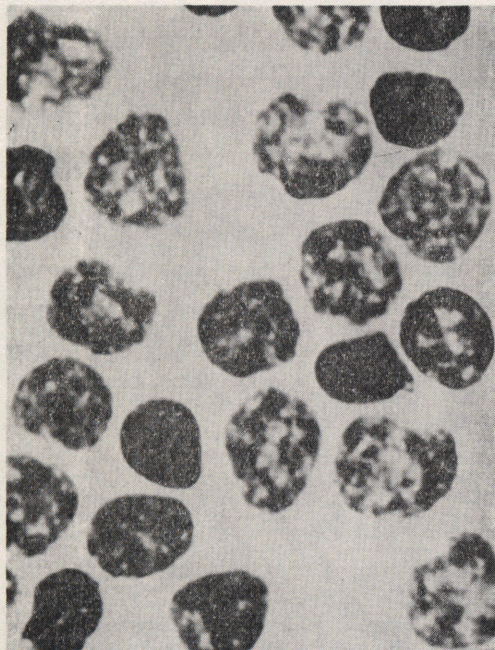


図 3・b 細胞は円型を呈し、不整は少ない
Giemsa 染色 ×1000

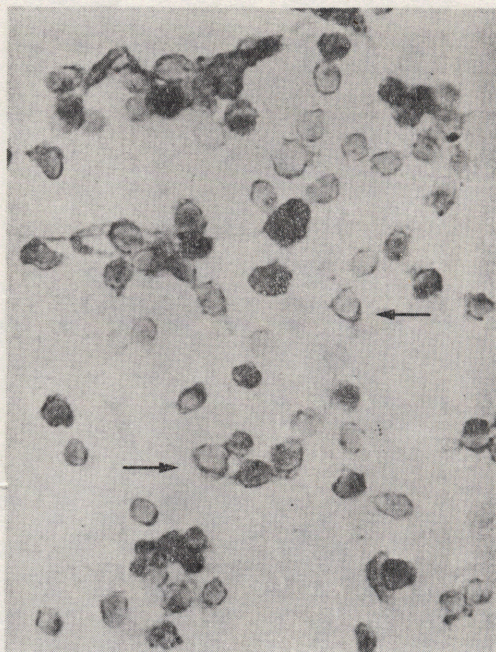


図 3・d IgG 陽性細胞 ×400

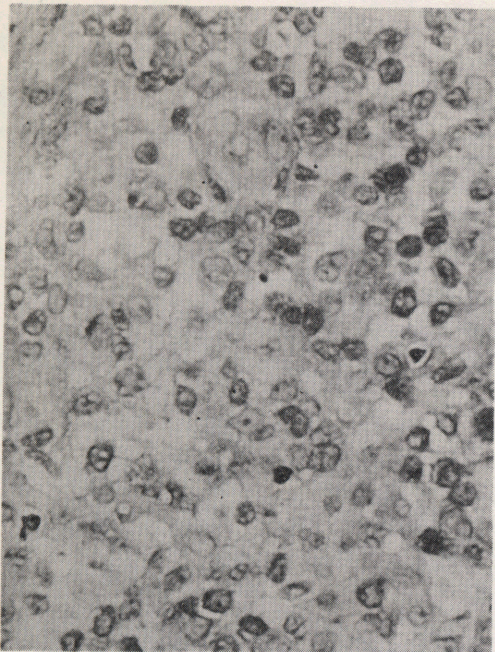


図 4・a H. E 染色

×400

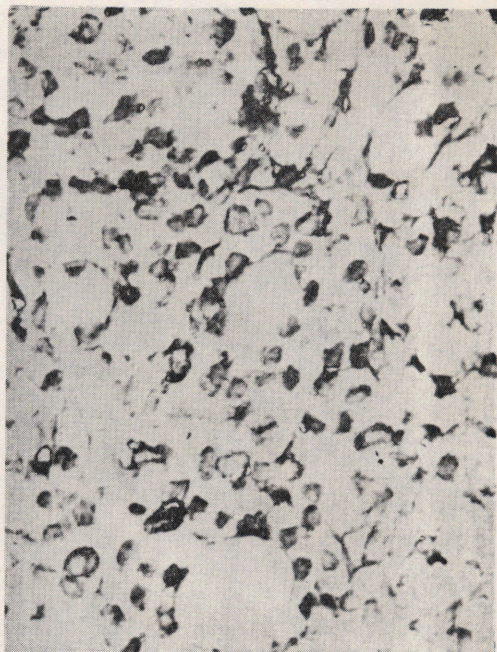


図 4・c IgG 陽性細胞

×400

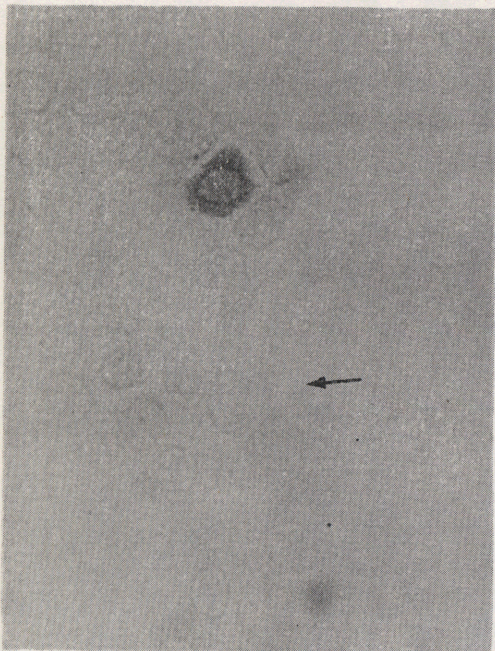


図 4・b β -Gase 染色 (陰性)

×1000

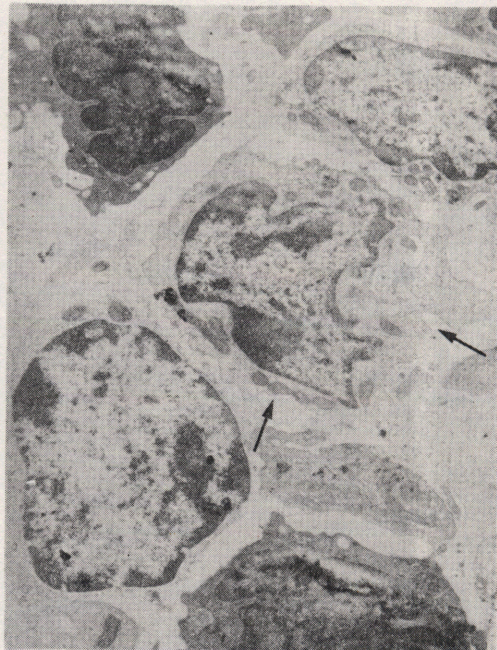


図 4・d 細胞表面の一部にアメーバ状突起と胞体内に mitochondria が目立つ

×4000

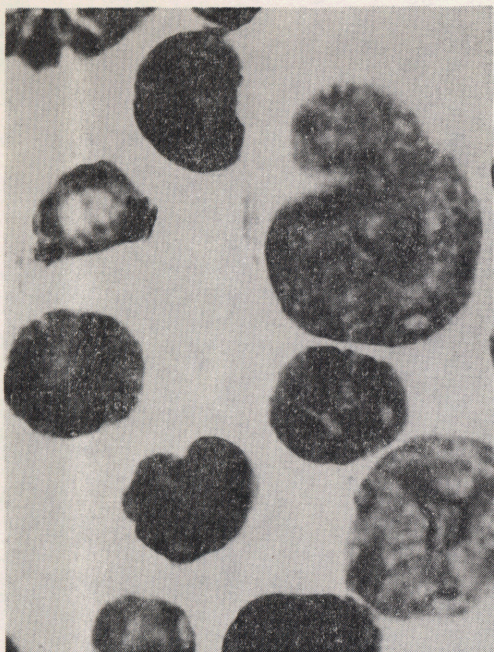


図 5・a 分葉型，切れ込み型の不整が著明
Giemsa 染色 ×1000

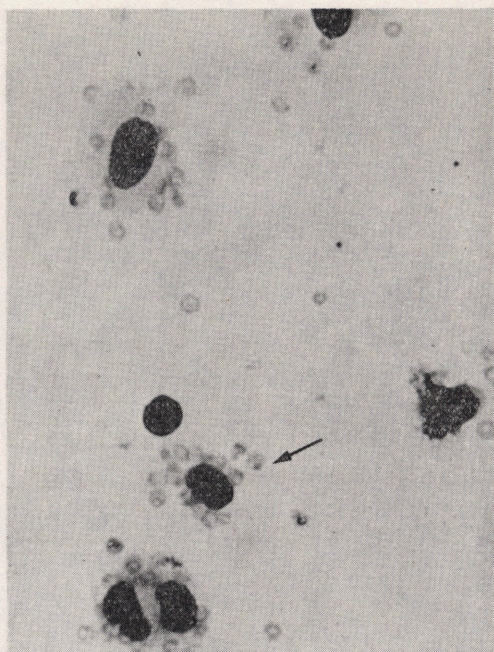


図 5・c E. rosset 形成 ×400

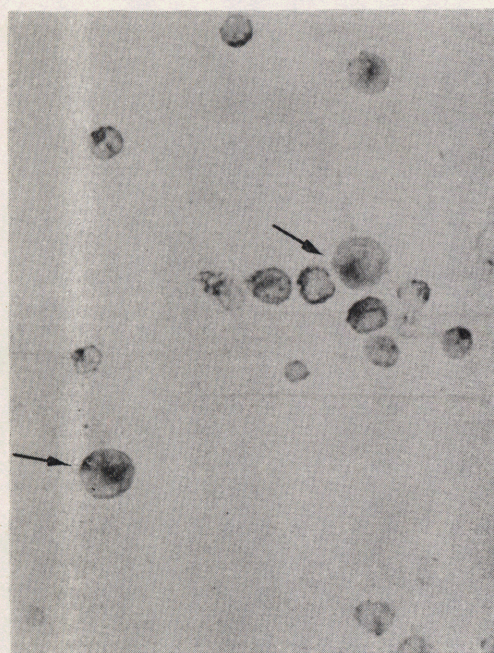


図 5・b dot 状の陽性を示す細胞
 β -Gase 染色 ×400

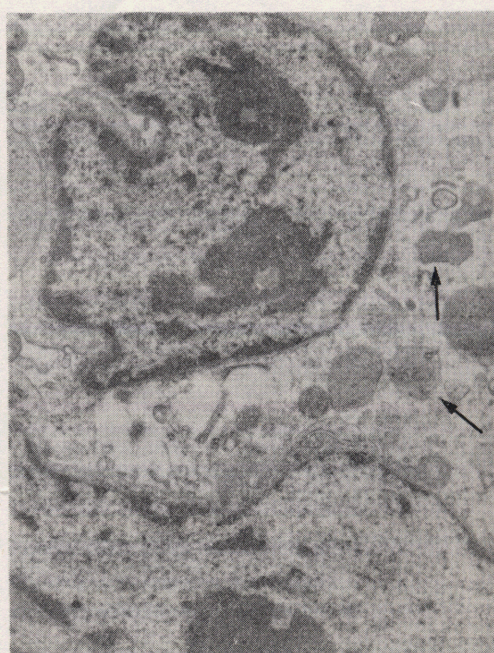


図 5・d 核の不整，細胞質内にやや大きな
lysosome vacuole を認める ×5000

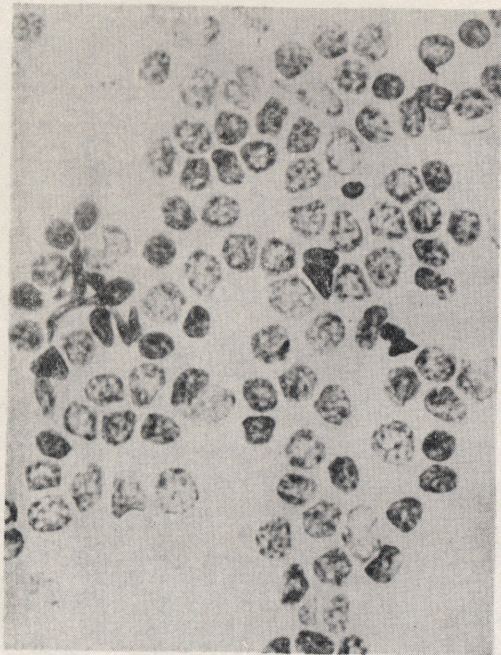


図 6・a H. E 染色

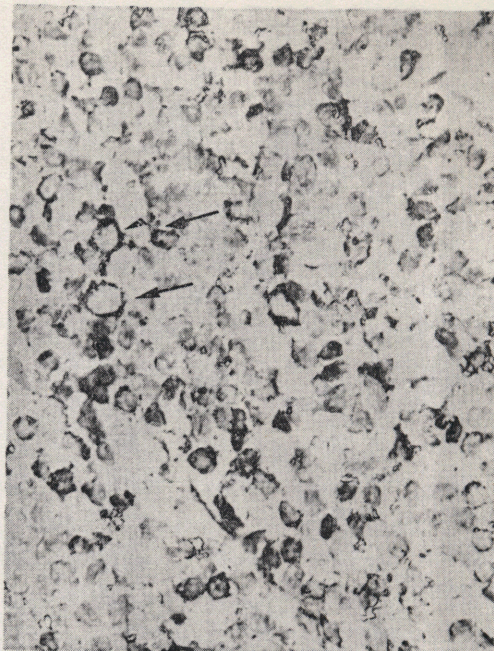


図 6・c IgG 陽性細胞

×400

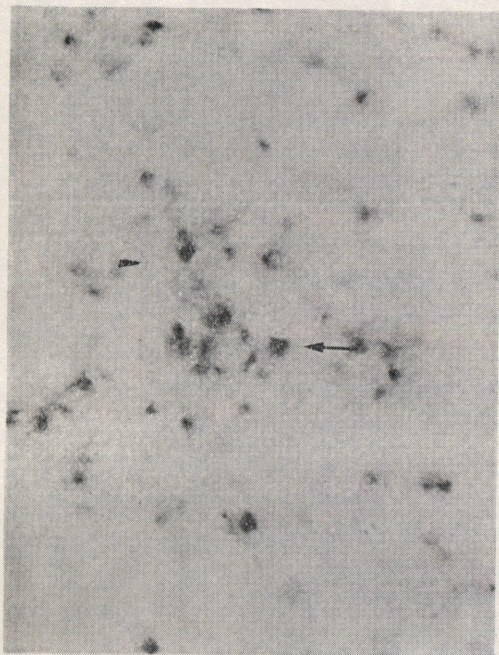


図 6・b β -Gase 染色 (陽性)

×400



図 6・d 細胞表面に多数の突起, 胞体内小器官
Golgi, E.R., mitochondria, lysosome の
発達が見られる

×5000

Case 2.

腫瘍増生はびまん性を示し、細胞の大きさは $4\sim 7\mu$ と比較的多形性を示し、 7μ 以上の細胞もみられた。核不整型は少なく、円型の細胞が主体を占めていた。酵素化学染色は N, Estase, AcPase 活性は弱く、 β -Gase にやや陽性反応がみられた。酵素抗体法は IgG が陽性を呈した。診断は、medium sized cell type 又は mixed type lymphocytic diffuse type, B cell lymphoma (図 3・a～d)。

Case 3.

組織検体は皮下組織腫瘍である。細胞はびまん性に浸潤し、一部腫瘍巣を形成、細胞の大きさは 6μ を中心に $7, 8\mu$ と大型を示す細胞もみられた。核不整型は円型細胞 84 % と多く、核不整は少ない。酵素化学染色は AcPase, β -Gase に軽度陽性反応がみられた。酵素抗体法は、IgG, IgA に陽性が著明であった。また、E. rosset 73 %, EAC. rosset 10 % とほぼ正常を示していた。電顕像では、細胞質の表面の一部にアメーバ状の突起がみられる。胞体内では、mitochondria の増加もみられた。核は円型～不整型を呈し、heterochromatin が目立っていた。診断は diffuse lymphocytic medium sized 又は mixed cell type, B cell lymphoma (図 4・a～d)。

Case 4.

この症例は、細胞の大きさは $4\sim 11\mu$ と細胞の大小不同は著しく、多形性に富む腫瘍細胞である。核不整型は湾曲型 31 %, 陥入型 11 %, 分葉型 5 % と不整が多くみられた。酵素化学染色は、AcPase, β -Gase に陽性がみられた。酵素抗体法については陽性細胞は少なかった。また、E. rosset 97.7 %, EAC. rosset 2.2 % と E. rosset 形成が多く、また電顕像からは、核の不整、核小体の増大、細胞質内に clustered dense body 等もみられた。これらから診断は、pleomorphic type, T cell lymphoma (図 5・a～d)。

Case 5.

細胞は 5μ を中心として、 $4\sim 6\mu$ に集中し

た分布を示す小型の細胞である。核不整型は、不整型が著しく、湾曲型 30 %, 陥入型 41 %, 分葉型 15 % を占め、いわゆる cleaved type に相当する型である。酵素化学染色では、AcPase, β -Gase に強い陽性反応がみられ、表面 marker globulin では、IgM に多くの細胞に陽性を呈した。電顕所見では細胞表面に多くの突起がみられ、核は不整型を示している。細胞質内は、mitochondria, 小胞体の発達がみられ、一部には lysosome や脂肪滴様物質もみられた。以上から総合判定すると、diffuse lymphoma, small cell type で B 細胞系、T 細胞系の両者の性格を有する細胞反応を示した。これらから、T, B 系由来は判定できなかった。診断は、diffuse lymphoma small cell type (図 6・a～d)。

III 考 案

悪性リンパ腫 5 症例について形態学的 pattern を基盤として、細胞の大きさ、核型を検索し、それらの細胞群の生物学的特異性を検討するために、組織化学及び免疫学的に解析を行った。その結果、細胞の大きさと核不整型についての検索では、腫瘍細胞の大きさをリンパ節血管内皮細胞と小リンパ球を 1 つの基準として、その腫瘍細胞の大きさを判定した。栗田⁷⁾、須知⁹⁾、若狭⁹⁾ らはリンパ腫の各型を出現するリンパ球の種類と大きさで各型を分類し、報告している。すなわち、びまん性リンパ腫では、small cell type は小リンパ球が主体をなし、medium cell sized type では細胞は血管内皮細胞より小さく、小リンパ球よりも大きいものが優勢を占め、更に mixed type では大型リンパ球細胞と前リンパ球の混合型が出現すると報告されている。今回の、我々の検索結果は、small cell type 例は出現細胞の大部分は小リンパ球が多くを占め、栗田⁷⁾ らは、リンパ球グループは単一型 pattern より成り立つという報告とほぼ一致した。しかし、細胞径が多形性を示した症例 2, 3 では、mixed type と medium cell sized との鑑別は得られなかった。悪性細

胞の表現法の1つとして、核の不整型が用いられる。須知⁹⁾、若狭⁹⁾らは、T・Bリンパ腫の形態的特徴の1つとして核型を検索し、T細胞系では核のねじれ (convoluted) 型、B細胞系では核の切れ込み (cleaved) 型が多いと報告している。我々の症例では、B細胞リンパ腫 (Case 1~3) 例では核不整は少なく、T細胞リンパ腫 (Case 4) 例では核不整型の出現率が高値を示し、それらの核型 pattern も既報^{8,10)}と一致していた。酵素組織化学法による細胞 marker の検索としては、N. Estase, AcPase, β -Gase 染色法を用いた。三方ら⁸⁾は、AcPase, N. Estase, β -Gase は、T細胞リンパ腫の腫瘍細胞内に限局性点状、dot 状の活性を認めたとし、T細胞系腫瘍の marker として重要であると報告されている。我々の検索でも (Case 4) に、AcPase, β -Gase の dot 状活性が得られた。更に、電顕的所見として菊地⁵⁾、玉置¹⁰⁾、渡辺¹¹⁾の報告によると、Bリンパ腫は細胞表面に絨毛性又はアメーバ状の突起を有し、核は円型又は切れ込み型で、核膜に heterochromatin を有し、細胞質は mitochondria に富む。Tリンパ腫は、細胞表面は平滑で、核は不整型を呈し、核小体が著明、細胞質内に clustered dense body や大きな lysosome vacuole を認めると報告されている。我々の検索では、Bリンパ腫例では菊地らの報告とほぼ一致しており、細胞表面に一部アメーバ状突起を有し、mitochondria の発達もみられた。Tリンパ腫例では、clustered dense body, lysosome vacuoles が認められた。これらの所見はT細胞が抗体産生機構において、抗原情報の伝達あるいは抗原への直接的返答などに関与する1つの働きを示唆される所見で腫瘍化時点で、なお、これらの構造を有していることは大変興味ある現象である。細胞表面 globulin marker 並びにヒツジ赤血球に対する、E. rosset, EAC. rosset の検索法⁴⁻⁶⁾は既に確立された1つの技術であり、本疾患の診断的立場から routine 化として行うべきと考えられ、今回の検索でも明らかな、T・B細胞に相関が得られた。

IV むすび

5症例を用い、形態学的に新分類法である LSG 分類を用いて診断し、それらの細胞について免疫、酵素化学及び純形態学的に解析を加え検討した結果、(1)B細胞系リンパ腫では、核不整型は円型が多く、一部には陥入型 cleaved type を呈し、Tリンパ腫では、核は陥入、分葉型を示し、convoluted 型を呈する。(2)酵素組織化学の細胞 marker では、Bリンパ腫は AcPase, β -Gase, N. Estase の活性は弱く、Tリンパ腫では点状又は dot 状を呈する活性がみられた。(3)免疫学的立場では、表面 marker globulin はBリンパ腫に著明に反応を呈していた。ヒツジ赤血球の E. rosset, EAC. rosset 法では、明らかにT、Bリンパ腫の鑑別の得られる方法である。(4)電顕的観察においては、Bリンパ腫では細胞表面にアメーバ状突起がみられ、細胞内小器官では粗面小胞体の発達がみられ、核は円型又は cleaved 型を呈し、Tリンパ腫では細胞質内に clustered dense body, lysosome vacuoles がみられ、核は convoluted 型がみられた。なお、本論文は静岡赤十字病院研究報第2巻に投稿したものである。

参考文献

- 1) 宮地 徹：臨床組織病理学，120~143，杏林書店，東京，1975
- 2) 岡林 篤：免疫病理学疾患，405~427，文光堂，東京，1979
- 3) 難波絃二：日本臨牀，35：3664~3671，1977
- 4) 浦野順文：同上，35：3705~3711，1977
- 5) 菊地浩吉ほか：最新医学，34：2025~2031，1979
- 6) 森 尚義ほか：同上，34：2032~2038，1979
- 7) 栗田宗次，須知泰山：細胞とその技術，322~335。
- 8) 三方淳男ほか：最新医学，34：2018~2024，1979
- 9) 須知泰山，若狭治毅：同上，34：2049~2062，1979
- 10) 玉置憲一：細胞，9：311~320，1977
- 11) 渡辺 昌：同上，9：298~310，1977